

BAB IV

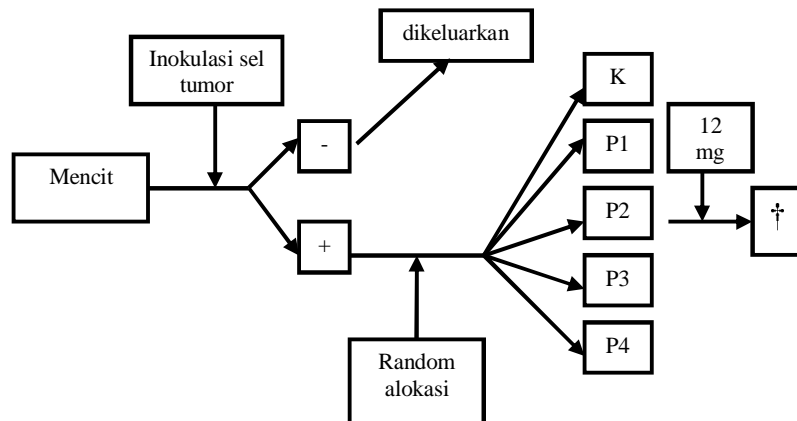
METODE PENELITIAN

4.1. Disain Penelitian :

Penelitian ini merupakan penelitian trial laboratoris dengan hewan coba menggunakan desain *post test only control group random design*. Yang dibagi dalam lima kelompok.

- K : Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat Adriamycin, Cyclophosphamide
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat Adriamycin, Cyclophosphamide, dan Phaleria macrocarpa 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari)
- P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat Adriamycin, Cyclophosphamide, dan Phaleria macrocarpa 0,14 mg /hari (0,7 mL /hari)
- P4 : Kelompok perlakuan 4, , mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat Phaleria macrocarpa 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari)

Skema rancangan penelitian



4.2. Sampel Penelitian

Hewan coba adalah mencit betina strain C3H yang berusia 8 minggu dengan berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi dan tidak ada abnormalitas anatomis. Mencit ini diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

4.3. Kriteria Inklusi:

- Mencit betina
- Strain C3H
- Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi.
- Setelah inokulasi tumor terdapat pertumbuhan tumor.

4.4. Kriteria Eksklusi:

- Selama inokulasi dan perlakuan mencit tampak sakit (tidak aktif)
- Setelah dilakukan inokulasi tidak tumbuh tumor

4.5. Besar Sampel

Menurut WHO tiap kelompok minimal lima ekor ⁴³, dengan cadangan 10% (1 ekor). Jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok yaitu enam ekor mencit.

$$ndo = \frac{n}{\underbrace{(-do)}} = \frac{5}{\underbrace{(-0,1)}} = 5,56 \approx 6$$

Tiga puluh mencit yang sudah berhasil diinokulasi secara random dikelompokkan menjadi lima kelompok yaitu:

Kelompok K : 6 mencit

Kelompok P1 : 6 mencit

Kelompok P2 : 6 mencit.

Kelompok P3 : 6 mencit

Kelompok P4 : 6 mencit

4.6. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Histologi UNDIP, Laboratorium Biokimia UNDIP, Laboratorium Bioteknologi UNDIP, Laboratorium Patologi Anatomi UNDIP, Lab Patologi Anatomi Universitas Gajah Mada.

4.7. Variabel Penelitian

4.7.1. Variabel bebas

Pemberian Adriamycin, Cyclophosphamide, dan *Phaleria macrocarpa*

4.7.2. Variabel tergantung

Ekspressi IFN- γ , ekspresi perforin, dan gambaran netrofil pada sumsum tulang

4.8. Definisi Operasional

1. Ekstrak *Phaleria macrocarpa* berasal dari ekstrak daging buah kering, yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metoda sokletasi, dengan konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,2 mg/mL, yang mengandung *3,4,5-trihydroxybenzoic acid* 10%, diberikan dengan dosis bertingkat 0,035mg/hari, 0,0715 mg/hari, dan 0,14 mg/hari. Adriamycin diberikan dengan dosis 0.013mg iv, sedangkan Cyclophosphamide diberikan 0,0156mg iv setiap 3 minggu sebanyak 4 siklus.

2. Kadar IFN- γ serum diukur dengan metoda ELISA dengan satuan ng/ml

Skala variabel : rasio

3. Ekspresi perforin dihitung dari jumlah semua sel mononuklear yang berwarna coklat dengan pewarnaan *antibody monoclonal anti-perforin* pada setiap 100 sel tumor, dan dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Penghitungan dilakukan di daerah yang bukan sentral nekrosis, dan dicari pada tepi tumor yang kontak dengan vaskularisasi, pada 5 lapangan pandang, diambil rata-rata persentasenya. Dilihat berurutan dari kiri ke kanan. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

Skala variabel : rasio

4. Gambaran netrofil pada sumsum tulang dinilai dengan menghitung sel netrofil absolut yaitu jumlah netrofil segmen dan batang. Dihitung menggunakan mikroskop dengan pembesaran objektif 40x dari dua ratus sel di sumsum tulang. Preparat sumsum tulang yang dibuat berasal dari biopsi tulang femur mencit dan diwarnai dengan pengecatan Giemsa. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

Skala variable : rasio

4.9. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan untuk perlakuan

Phaleria macrocarpa yang digunakan adalah ekstraknya, diperoleh

dengan cara :

1. 1 kg daging buah *Phaleria macrocarpa* yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50g) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 – 10 kali.
2. Hasil ekstrak dimasukkan dalam laburotary evaporator dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C).
3. Ekstrak dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 1 jam untuk menguapkan etanol.

4. Didapatkan hasil 5,5mg ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%), yang mengandung *3,4,5-trihydroxybenzoic acid* 10%, dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2mg/mL .

Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram 1 x sehari ³⁷, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026 ⁴⁸ dikalikan konstanta hasil ekstrak 0,0055, sehingga dosis yang diberikan adalah $5000 \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715$ mg/hari (0,36 mL). Kami juga memberikan dosis 0,035mg (0,175 mL)/hari dan 0,14 mg (0,7 mL)/hari.

Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit

1. Alkohol 70 %
2. Larutan Garam fisiologik
3. Es batu
4. Mencit donor bertumor
5. Mencit resipien

Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

1. Phospat buffer formalin 10%
2. Alkohol 70%, 80%, 96%, absolute
3. Xylol
4. Parafin cair (Histoplast)
5. Albumin dan Poly-L-Lysine
6. Bahan pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE)
7. Bahan pengecatan Giemsa

8. Canada balsam dan Entelan

Bahan tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia

1. Antibodi primer: *Mouse Monoclonal Antibody (MoAb)*
2. *Kit Universal Streptavidin-Biotin (EnVision-DakoCytomation^R)*

Bahan tambahan untuk pemeriksaan ELISA

1. *Peritoneal Exudate Cells* (PEC) dari mencit betina strain C3H (hewan percobaan)
2. RPMI 1640.
3. *Foetal Bovine Serum* (FBS)
4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
5. Metanol, Larutan Giemsa, Tripan Blue
6. Aquadest steril

Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit

1. Cawan petri ukuran 6 Cm
2. Cawan petri ukuran 15 Cm
3. Cawan ukuran 10 Cm
4. Sduit 1cc
5. Jarum suntik trocar
6. Gunting lurus 10 Cm
7. Gunting bengkok 10 Cm
8. Pinset anatomi 10 Cm
9. Pinset biasa 12 Cm
10. Alas fiksasi

Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E dan Giemsa :

1. *Digital Tissue Processor Leica^R*
2. *Tissue Blocking Leica^R EG-1160*
3. Inkubator suhu 56⁰ C *Memmert^R*
4. Mikrotom *Leica^R RM-2135*
5. *Auto Stainer Leica-XL^R*
6. Kaca obyek dan kaca penutup

Alat tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia :

1. Pensil PAP
2. *Waterbath*
3. Tempat pewarnaan dan pencucian
4. *Timer*
5. Pipet serologic
6. Kertas saring
7. *Freezer*
8. *Microwave Toshiba^R*
9. Tabung plastic dan pipet *Ependorf*

Alat tambahan untuk pemeriksaan ELISA

- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 1. Mikroskop | 2. Inkubator buatan Schwabach |
| 3. Spuit 1cc, 10 cc | 4. Termometer |
| 5. Tabung Sentrifus 15 cc, 50 cc | 6. Tabung reaksi dengan alas datar |
| 7. Lampu Bunsen | 8. Tabung reaksi biasa |

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 9. Cawan Petri | 10. Kaca benda |
| 11. Gunting bengkok dan lurus | 12. Trokar |
| 13. Kanul mulut | 14. Pinset, scalpel |
| 15. Pipet Pasteur & Pipet Eppendorf | 16. <i>Yellow & Blue tape</i> |
| 17. ELISA reader | 18. Autoclav |
| 19. <i>Laminar Flow</i> | 20. <i>Colony Counter</i> |
| 21. Timbangan elektronik dan biasa | 22. Cover slip bulat Ø 13mm |
| 23. 18 buah kandang hewan coba individual | |
| 24. Alat sentrifugasi yang dilengkapi pengatur suhu | |

Alat untuk mengukur berat badan :

Timbangan elektronik dan biasa dengan satuan gram

Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan adalah :

- 1 Unit *Multi Head Microscope Olympus^R*
- *Nikon^R Digital Net Camera DN 100 + SD Card*

4.10. Pelaksanaan Penelitian

Cara perlakuan

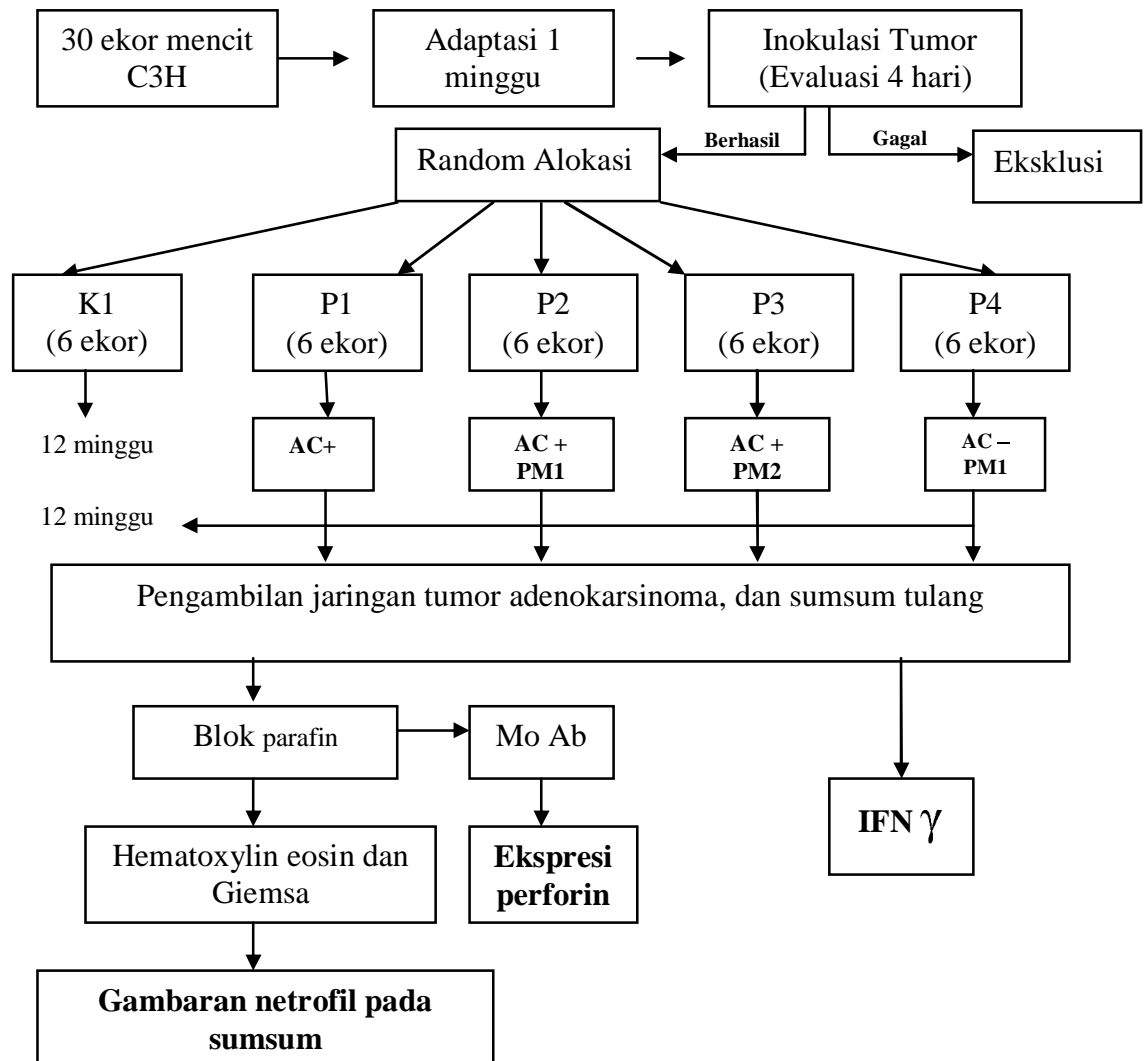
Tiga puluh ekor mencit betina strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara *ad libitum*.

Tiga puluh ekor mencit tersebut diukur berat badannya sebelum perlakuan dan kemudian diinokulasi tumor, diamati selama 4 hari, dan jaringan tumor yang

disuntikkan tidak mengalami regresi. Mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 5 kelompok yang ditentukan secara acak dan diberikan perlakuan sesuai alur kerja. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum ad libitum..

Mencit diukur berat badannya dan selanjutnya di anaestesi dengan ether dan dibunuh dengan dislokasi vertebra cervical, kemudian diambil jaringan tumor dan sumsum tulangnya. Jaringan tumor dan sumsum tulang diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat blok paraffin.

4.11. Alur kerja



4.12. Prosedur Pemeriksaan

Prosedur transplantasi tumor

- Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.

- b. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
- c. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
- d. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh di cawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah / potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk “bubur tumor” yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.
- e. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.
- f. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.
- g. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya (lihat bagan) dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi

Prosedur pembuatan preparat histopatologi adenokarsinoma dan sumsum tulang

a. Fiksasi

Potongan adenokarsinoma dan sumsum tulang dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium Phospat sampai mencapai pH 7,0). Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Potongan adenokarsinoma dan sumsum tulang dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2 x 2jam.

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

d. Embedding .

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58⁰C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator suhu 56-58⁰C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam:

- | | | | |
|--------------------------------------|-----------|------------------|----------|
| 1. Xylol | 1 menit | 11. Air | 15 detik |
| 2. Xylol | 2 menit | 12. Alkohol 80% | 15 detik |
| 3. Xylol | 2 menit | 13. Alkohol 96% | 30 detik |
| 4. Alkohol 100% | 2 menit | 14. Alkohol 100% | 45 detik |
| 5. Alkohol 96% | 2 menit | 15. Xylol | 1 menit |
| 6. Alkohol 70% | 1 menit | 16. Xylol | 1 menit |
| 7. Air | 1 menit | | |
| 8. Mayer HE | 7,5 menit | | |
| 9. Air | 7,5 menit | | |
| 10. Eosin (0,5%)–alcohol–asan asetat | 1 menit | | |

f. Pewarnaan jaringan sumsum tulang dengan Giemsa

1. Fixasi preparat dengan methanol selama 15 menit
2. Ambil preparat dan keringkan di udara
3. Teteskan larutan Giemsa selama 15 menit
4. Cuci preparat dengan aquabidest
5. Keringkan dengan posisi vertikal

Prosedur pengambilan sampel dari hewan percobaan untuk pemeriksaan ELISA

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan chloroform. Mencit diletakan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%.
2. Suntikkan 5 ml medium RPMI yang mengandung 2% FBS ke dalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan.

3. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus.
- Aspirat yang didapat kemudian disentrifus pada 400G, 4°C selama 10'.
 - Supernatan dibuang, cuci 2X dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
 - Kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI komplet (RPMI 1640 yang mengandung *L-glutamin* (1mM), *Foetal Bovine Serum* (FBS)5% dan ditambah antibiotika Penicillin 50 unit dan streptomycin 50µg per ml) dan disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
 - Buang supernatan dan bila perlu larutkan dengan 3% asam asetat dalam PBS untuk melisiskan sel darah merah kemudian disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
 - Cuci dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
 - Resuspensikan dengan medium komplet.
 - Jumlah sel yang didapat dihitung menggunakan bilik hitung Neubauer setelah diwarnai dengan Tripkan Blue sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan 10^6 / ml.

Prosedur pemeriksaan sitokin

1. Masukkan 100 μ l suspensi $1-1,2 \times 10^6$ sel/ ml dalam setiap *plate* kultur yang berisi 96 *wells* atau 24 *wells*.
2. Inkubasikan selama 2-3 jam pada 37°C, 5% CO₂ untuk makrofag adheren.
3. Buang sel-sel non adheren dengan aspirasi.
4. Ganti medium.
5. Kultur sel dalam medium komplet selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C.
6. Lakukan pengukuran akumulasi nitrit pada kultur supernatan sebagai berikut:
 1. Untuk memeriksa produksi nitrit digunakan 96 *wells microplate* ELISA dengan dasar rata.
 2. Masukkan 100 μ l Reagen chromogenic dalam *microplate* ELISA dengan dasar rata.
 3. Pipet 100 μ l supernatan yang hendak ditest dalam *plate* dengan duplikasi atau triplikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blanko.
 4. Tunggu selama 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan stabilisasi.
 5. Ukur absorbansi pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (SLT LABINSTRUMENS Model 16 570)

6. Buat kurva standar menggunakan analisis regresi linier sederhana/ simpel dari pembacaan standar . Hitung konsentrasi sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi.

4.13. Analisis Data

Data deskriptif hasil penelitian disajikan dalam bentuk grafik. Normalitas data diuji dengan menggunakan *Shapiro-Wilk test*, apabila distribusi data normal dan homogen, dilakukan analisis secara parametrik dengan *One Way Anova*. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferroni dan Tamhane*. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $P \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan *software SPSS Ver. 10.0 for Windows*